Aus dem Institut für Arbeits- und Sozial-Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Professor Dr. med. H.Valentin)

Zinkkonzentrationen in der normalen und cirrhotischen Leber

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Peter Skilandat
aus
Nürnberg

1970

D 29

1971 № 287

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Professor Dr. med. H. Valentin
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. G. Lehnert
Tag der mündlichen Prüfung: 15. Mai 1970

SONDERDRUCK AUS

ÄRZTLICHE FORSCHUNG

Zeitschrift über die Forschungsergebnisse der gesamten Medizin

Wissenschaftlicher Beirat

H.-E. Bock, Tübingen / H. G. Borst, Hannover / H. J. Bretschneider, Göttingen / W. Doerr, Heidelberg / H. Eyer, München / A. Fleckenstein, Freiburg / W. D. Keidel, Erlangen / H. Lüllmann, Kiel / H. Meessen, Düsseldorf / G. Peters, München / H. Remmer, Tübingen / H. Schaefer, Heidelberg / W. Schneider, Tübingen / W. Schulte, Tübingen / J. Ströder, Würzburg / A. Struppler, München / E. Tonutti, Ulm / Th. Uexküll, Ulm / L. Weissbecker, Kiel

Schriftleitung: K. Brecht, Tübingen/Ulm

XXIV. Jahrgang, Heft 7 (S. 193—196) vom 10. Juli 1970

Hans-Günther Essing, Peter Skilandat*), Karl-Heinz Schaller, Dieter Szadkowski

Zinkkonzentrationen in der normalen und cirrhotischen Leber

Zinc Concentration in Normal and Cirrhotic Livers

Aus dem Institut für Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Valentin)

*) D 29

WERK-VERLAG DR. EDMUND BANASCHEWSKI · MÜNCHEN-GRÄFELFING

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

HANS-GÜNTHER ESSING, PETER SKILANDAT, KARL-HEINZ SCHALLER
und DIETER SZADKOWSKI

Zinkkonzentrationen in der normalen und cirrhotischen Leber

Zinc Concentration in Normal and Cirrhotic Livers

Aus dem Institut für Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Valentin)

Zur Klärung der Frage, ob ein Zusammenhang zwischen negativer Zinkbilanz und chronischen Lebererkrankungen besteht, wurde in der vorliegenden Arbeit das Verhalten der Leberzinkkonzentrationen bei cirrhotischen Organveränderungen im Vergleich mit Normallebern ermittelt. Aus arbeitsmedizinischer Sicht ist nämlich durch frühere Untersuchungen an Hitzearbeitern ein statistisch signifikanter Abfall der Serumzinkkonzentration bekannt, während von anderer Seite gehäuft Lebererkrankungen dieser Berufsgruppe beobachtet wurden. Es wurde in 43 autoptisch gewonnenen Leberproben (15 davon histologisch gesicherte Lebercirrhosen) die Zinkkonzentration bestimmt und bei einem Teil dieser Gewebsproben auf deren DNS-P-Gehalt bezogen. Die mittlere Zinkkonzentration cirrhotischer Organe war mit 19,8 ± 5,0 mg Zn/100 g TG gegenüber 31,3 ± 9,0 mg Zn/100 g TG bei Normallebern statistisch hoch signifikant erniedrigt. Ebenso deutlich signifikant vermindert war der mit Hilfe eines Quotienten auf den Zellanteil bezogene Zinkgehalt bei Lebercirrhosen (0,14 ± 0,07 Zn/DNS) im Vergleich mit normalen Organen (0,26 ± 0,07). Die Ergebnisse werden dahingehend interpretiert, daß bei Lebercirrhosen nicht nur eine in der Literatur beschriebene Verminderung der Serumzinkkonzentration, sondern auch ein verringerter Zinkgehalt im Lebergewebe nachgewiesen werden kann.

The levels of zinc concentration in normal and cirrhotic livers are compared. In 43 cases liver tissue was obtained by biopsy (28 normal, 15 cirrhotic). In 24 cases the zinc concentration was related to the DNA content for avoiding any effect of different blood contents in the liver samples.

The zinc concentration in cirrhotic livers (mean 19,8 mgr.Zn/100 gr. d. w., s. d. 5,0) was below the concentration in normal liver tissue (mean 31,3 mgr. Zn/100 gr. d. w., s. d. 9,0). A similar deviation was found in the DNA-related data: normal livers 0,14 ± 0,07 mgr. Zn/mgr. DNA, Cirrhotic livers 0,26 ± 0,07 mgr. Zn/mgr. DNA. Both differences are statistically high significant. These results show that in liver cirrhosis the zinc concentration is decreased not only in serum but also in liver tissue.

Zinkgehalt (in normaler und cirrhotischer Leber) — DNS-Gehalt (Leber) — Leber (normal) — Leber (cirrhotisch)

zinc (concentration in normal and cirrhotic liver) — DNA content (liver) — liver (normal) — liver (cirrhotic)

1.0 *Einleitung*

Zink ist als ein essentielles Bioelement notwendig für den Aufbau zahlreicher Metalloenzyme und weist neben anderen letztlich noch nicht völlig geklärten Funktionen für manche Enzyme eine Schutzwirkung gegen Proteasen auf (Lit. bei *Szadkowski*, 1969). Bei einer Anzahl von Erkrankungen sind Veränderungen der Serumzinkkonzentrationen bekannt, wie z. B. bei akuten und chronischen Infekten, Schilddrüsenerkrankungen, Achylia gastrica und Lebercirrhosen (*Wolff* u. Mitarb., 1964; *Rosner* u. Mitarb., 1968).

Auf dem arbeitsmedizinischen Sektor fanden *Szadkowski* u. Mitarb. (1969) eine statistisch signifikante Erniedrigung der Serumzinkkonzentration bei chronisch hitzeexponierten Schwerarbeitern. *Koelsch* (1963) wies andererseits darauf hin, daß bei dieser Berufsgruppe gehäuft Lebererkrankungen

auftreten. Von der Zinkkonzentration des Serums kann jedoch nicht unbedingt auf die des Metalls in der Leber geschlossen werden. Zur Klärung der Zusammenhangsfrage zwischen einer negativen Zinkbilanz und chronischen Leberparenchymschäden erschien es daher notwendig, den Zinkgehalt normaler und cirrhotischer Organe zu bestimmen. Dabei sollte durch Beziehung der Zinkkonzentration auf den Desoxyribonucleinsäure (DNS)-Anteil des Leberparenchyms eine Standardisierung versucht werden.

2.0 *Methode*

2.1 *Probenauswahl*

Bei 43 autoptisch gewonnenen Leberproben[1]) wurde die Zinkkonzentration bestimmt; in 24 dieser Gewebsstücke erfolgte zusätzlich eine Messung des DNS-Gehaltes. In 15 Fällen war eine Lebercirrhose histologisch gesichert, die übrigen 28 Lebern waren unauffällig.

2.2 *Zink- und DNS-Bestimmungen*

Zur chemischen Analyse wurden die Organteile gefriergetrocknet und anschließend im Mörser pulverisiert.

2.21 *Zinkbestimmungen*

Je ein aliquoter Teil des pulverisierten Materials der 43 Leberproben wurde im Kaltveraschungsgerät (Tracer-Lab-LTA-600) verascht (*Lehnert*, 1969). Nach Aufnahme des weißen Rückstandes in 5 ml 2 N Salzsäure und Zugabe von destilliertem Wasser auf 100 ml erfolgte die Bestimmung des Zinkgehaltes durch atomabsorptionsspektrometrische Endpunktmessung.

2.22 *DNS-Bestimmung*

2.221 *Reagenzien*

Azetaldehyd (1,6%): 50 ml destilliertem Wasser wird 1 ml gekühlter Azetaldehyd mit einer gekühlten Pipette zugegeben. Die Lösung ist bei 4° C mehrere Monate haltbar.

Diphenylamin-Reagenz: 1,5 g Diphenylamin werden in 100 ml Eisessig gelöst und anschließend mit 1,5 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Kurz vor Gebrauch fügt man 0,1 ml des 1,6%igen wäßrigen Azetaldehyds zu 20 ml des Reagenzes.

Standardlösung: 15 mg DNS werden in 50 ml 5 mM NaOH gelöst. Von dieser Stammlösung werden jeweils 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 ml zu 5 ml N Perchlorsäure zugegeben und für 15 Minuten auf 70° erhitzt. Beide Lösungen sind 6 Monate haltbar.

2.222 *Extraktion der DNS*

Je 10 mg Trockensubstanz aus 24 Leberparenchymproben wurden entsprechend dem von *Ceriotti* (1955) angegebenen Verfahren in 3 ml einer 10%igen Perchlorsäure im Zentrifugenglas für 20 Minuten auf 70° C erhitzt, danach zentrifugiert und in einen 10 ml Meßkolben dekantiert. Das Zentrifugat wurde nochmals mit Perchlorsäure unter den gleichen Bedingungen behandelt, die Überstände vereinigt und mit Perchlorsäure auf 10 ml aufgefüllt. Die Endpunktbestimmung der DNS erfolgte nach der von *Burton* (1956) angegebenen photometrischen Methode mit Diphenylamin. Nach Zugabe von 0,1 ml der Azetaldehydlösung zu 20 ml des Diphenylaminreagenzes wurden 2 ml dieser Diphenylaminlösung mit 1 ml der Extraktlösung in einem Zentrifugenglas über 17 Stunden bei 30° C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung des DNS-Gehaltes mit dem Beckman-Photometer DU bei 600 mμ. Die gewonnenen Meßdaten wurden in DNS-Phosphat umgerechnet. (Der DNS-Phosphatanteil beträgt 29% des gesamten DNS-Gehaltes [*Horstmann*, 1969]).

2.3 *Bezug der Zinkkonzentration auf den Zellanteil*

Um variable Störgrößen (Blut, intercelluläre Flüssigkeit usw.) bei den Zinkbestimmungen im Leberparenchym weitgehend zu eliminieren, wurde als Bezugsgröße der DNS-Gehalt der Leber gewählt. Dieser steht in linearer Beziehung zur Zellzahl (*Hoppe-Seyler, Thierfelder*, 1960; *Long*, 1961). Diese ist durch den Quotienten

$$Q = \frac{\text{Zinkgehalt (mg\%)}}{\text{DNS-Phosphatgehalt (mg\%)}}$$

gegeben (*Wilke* u. Mitarb., 1968).

2.4. *Statistische Auswertung*

In Anlehnung an *Ostle* (1966) und *Weber* (1967) wurden Berechnungen von Mittelwerten, Standardabweichungen und t-Tests nach *Student* durchgeführt.

3.0 *Ergebnisse*

Die mittlere Zinkkonzentration von 43 Lebern, bezogen auf ihr Naßgewicht, ist in Tabelle 1 angegeben.

In Tabelle 2 sind die Leberzinkkonzentrationen in 24 Proben, bezogen auf ihr Naß- und Trockengewicht, sowie der DNS- bzw. DNS-Phosphatgehalt der Lebern (Trockengewicht) zusammengestellt.

Die Zinkkonzentration, bezogen auf den DNS-Gehalt, findet sich in Tabelle 3.

4.0 *Diskussion*

Wie die hier vorgelegten Untersuchungsergebnisse zeigen, beträgt der mittlere Zinkgehalt *normaler Lebern* 31,3 mg/100 g Trockengewicht und 8,7 mg/100 g Naßgewicht. Die *cirrhotisch veränderten Lebern* weisen mit 19,8 mg/100 g Trockengewicht (5 mg/100 g Naßgewicht) einen statistisch hoch signifikant niedrigeren Zinkgehalt auf. Diese Resultate stimmen mit den von *Butt* u. Mitarb. (1960) gewonnenen Ergebnissen gut überein; sie liegen jedoch,

Tabelle 1

Mittelwerte und Standardabweichungen der Zinkkonzentrationen in normalen und cirrhotischen Lebern (Naßgewicht, NG)

	Normal	*Cirrhose*
n	28	15
Zn (mg/100 g NG)		
$\bar{x}$	7,2	4,5
s	2,7	1,4
t	3,68***	

t***: $p < 0{,}001$

[1]) Den Pathologischen Instituten der Universitäten Erlangen-Nürnberg und München sowie der Städtischen Krankenanstalten Nürnberg sei für die Überlassung des Untersuchungsmaterials gedankt.

Tabelle 2

Mittelwerte und Standardabweichungen der Zinkkonzentrationen und des DNS- bzw. DNS-Phosphatgehaltes in Normallebern und cirrhotischen Lebern (Trockengewicht, TG).

	Normal		*Cirrhose*
n	12		12
Zn (mg/100 g NG)			
$\bar{x}$	8,7		5,0
s	2,9		1,2
t		4,126***	
Zn (mg/100 g TG)			
$\bar{x}$	31,3		19,8
s	9,0		5,0
t		3,851***	
DNS (mg/100 g TG)			
$\bar{x}$	350,0		460,0
s	120,0		210,0
t		—1,490	
DNS-P (mg/100 g TG)			
$\bar{x}$	121,0		158,0
s	42,0		74,0
t		—1,481	

t***: $p < 0{,}001$

wahrscheinlich methodisch bedingt, insgesamt etwas höher.

Die zur Ermittlung des Zellanteils erforderlichen Bestimmungen der DNS bzw. des DNS-P ergaben für Lebercirrhosen im Vergleich zu Normallebern erhöhte Werte; die Differenzen ließen sich jedoch statistisch nicht sichern. Bezieht man die Zinkkonzentration auf den DNS-P-Gehalt, so errechnet sich entsprechend Absatz 2.3 für normale Organe ein Quotient von 0,26, für cirrhotische Lebern ein solcher von 0,14. Dieser Unterschied ist statistisch hoch signifikant und stimmt mit den auf das Trocken- bzw. Naßgewicht bezogenen Zinkkonzentrationen der Leber gut überein. Damit kann gesagt werden, daß bei Lebercirrhosen nicht nur eine Verminderung des Zinkgehaltes im *Serum* erfolgt (*Vallee* u. Mitarb., 1956; *Sullivan* u. Mitarb., 1962; *Seichiro*, 1963; *Prasad* u. Mitarb., 1965; *Kallai* u. Mitarb., 1968; und *Rosner* u. Mitarb., 1968), sondern auch eine Erniedrigung des Zinkgehaltes im *Leberparenchym* objektiviert werden kann. Eine Beeinflussung dieser Ergebnisse durch einen evtl. unterschiedlichen intra- und extrazellulären Flüssigkeitsgehalt der Leberproben konnte mit der Standardisierung durch DNS bzw. DNS-P ausgeschlossen werden. Inwieweit die Konzentrationsänderungen dieses Metalls in den erwähnten Verteilungsräumen miteinander korrelieren, muß noch dahingestellt bleiben.

Tabelle 3

Mittelwerte und Standardabweichungen der Zinkkonzentrationen, bezogen auf den DNS-Gehalt in Normallebern und cirrhotischen Lebern.

	Normal		*Cirrhose*
n	12		12
Zn/DNS-P			
$\bar{x}$	0,26		0,14
s	0,07		0,07
t		4,190***	

t***: $p < 0{,}001$

Hinsichtlich der *pathogenetischen Zusammenhänge* wäre es einerseits denkbar, daß bei cirrhotischen Lebern infolge der hochgradig eingeschränkten Organfunktion die zinkbindenden Eiweißfraktionen qualitativ oder quantitativ pathologisch verändert sind. Damit könnte ein Verbleiben des Metalls im Leberparenchym evtl. nicht mehr gewährleistet sein. *Sheline* u. Mitarb. (1943) fanden allerdings bei Leberschäden keine Beziehung zwischen dem Verhalten des Serumzinks und dem der zinkbindenden Serumeiweißfraktionen. Zum anderen könnte einem verminderten Zinkangebot an die Leberparenchymzellen eine Bedeutung hinsichtlich der Entstehung von Leberschäden beizumessen sein. So beschrieben *Prasad* u. Mitarb. (1963) Leberveränderungen bei Untersuchungen an Persern und Ägyptern, die einen ernährungsbedingten Zinkmangel aufwiesen. *Vallee* u. Mitarb. (1956, 1957) wiesen bei einem an Lebercirrhose erkrankten Patienten erniedrigte Serum-Zinkkonzentrationen und erhöhte Ausscheidungen dieses Metalls im Harn nach. Durch tägliche orale Zinksulfatgaben erreichten sie eine Verminderung der Zinkurie und eine deutliche Abnahme der Bromthaleinretention.

Zur Klärung des ätiologischen und pathogenetischen Zusammenhanges zwischen einer Cirrhose und den statistisch signifikant erniedrigten Leberzinkkonzentrationen können die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zwar nicht beitragen. Sie liefern jedoch einen weiteren Baustein für die Bearbeitung des eingangs aufgezeigten arbeitsmedizinischen Fragenkomplexes der industriellen Hitzebelastung. Durch weiterführende tierexperimentelle Studien müßte geprüft werden, inwieweit der von *Szadkowski* u. Mitarb. (1969) nachgewiesene verminderte Zinkgehalt des Serums unter Hitzebelastung mit der von *Koelsch* (1963) beschriebenen Häufung von Lebererkrankungen bei beruflich Hitzeexponierten in einem ursächlichen Zusammenhang steht. Dabei wäre insbesondere zu untersuchen, ob unter Hitzeexposition auch der Zinkgehalt der Leber abnimmt und so als Ursache für eine chronische Leberparenchymschädigung wirkt, oder ob es infolge bisher noch unbekannter Faktoren bei Hitzearbeitern zu Lebererkrankungen kommt, die zu einem sekundären Zinkmangel führen.

Schrifttum:

Burton, K. (1956): A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of the desoxyribonucleic acid. Biochem. J. *62*, 315.

Butt, E. M., R. E. Nusbaum, T. C. Gilmour, S. L. Didio (1960): Trace metal patterns in disease states: Hemochromatosis, Bantu siderosis and iron storage in Laennec's cirrhosis and alkoholism in: *Seven, M. J., L. A. Johnson:* Metal-binding in medicine. Philadelphia, Montreal: J. B. Lippincott.

Ceriotti, G. (1955): Determination of nucleic acids in animal tissues. J. biol. Chem. *214*, 59.

Hoppe-Seyler, F., H. Thierfelder (1960): Handbuch der Chemie, Bd. IV, Teil 2, 1310 Berlin — Göttingen — Heidelberg: Springer.

Horstmann, J. (1969): Persönliche Mitteilung.

Kallai, L., M. Keler-Bacoka, M. Marimcovic, S. Knezevic, A. Stojanovski und *Z. Kosutic* (1968): Zinkwerte im Serum bei Leberkrankheiten. Schweiz. Med. Wschr. *98*, 1007.

Koelsch, F. (1963): Lehrbuch der Arbeitsmedizin, Band I, 609. Stuttgart: Ferdinand Enke.

Lehnert, G., G. Stadelmann, K.-H. Schaller, D. Szadkowski (1969): Usuelle Bleibelastung durch Nahrungsmittel und Getränke. Arch. Hyg. *153*, 403.

Long, C. (1961): Biochemists handbook, 676, London: Van Nostrand.

Ostle, B. (1966): Statistics in research. Ames, Iowa: The Iowa state university press.

Prasad, A. S., A. Jr. Miale, Z. Farid, H. H. Sandstead, A. R. Schulert (1963): Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism and hypogonadism. J. Lab. clin. Med. *61*, 537.

Prasad, A. S., H. H. Sandstead, A. R. Schulert, A. S. Rooby (1963): Urinary excretion of zinc in patients with the syndrome of anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism and hypogonadism. J. Lab. clin. Med. *62*, 591.

Prasad, A. S., D. Oberleas, J. A. Halsted, R. S. Collins (1965): Determination of zinc in biological fluids by atomic absorption spectrophotometry in normal and cirrhotic subjects. J. Lab. clin. Med. *66*, 508.

Rosner, F., P. C. Gorfien (1968): Erythrocyte and plasma zinc and magnesium levels in health and disease. J. Lab. clin. Med. *72*, 213.

Seichiro, T. (1960): Chem. Abstr. *54*, 712. Zit. in *Bersin, Th.:* Biochemie der Mineral- und Spurenelemente. Frankfurt/M.: Akad. Verlagsges. 1963.

Sheline, G. E., J. L. Chaikoff, H. B. Jones, M. L. Montgomery (1943): Untersuchungen über das Verteilungsmuster intravenös und peroral verabreichten Radiozinks an Hunden. J. Biol. Chem. *149*, 139.

Sullivan, J. F., H. G. Lankford (1962): Urinary excretion of zinc in alkoholism and postalkoholic cirrhosis. Am. J. Clin. Nutr. *10*, 153.

Szadkowski, D., H.-P. Ehrhardt, K.-H. Schaller, G. Lehnert (1969): Der Zink- und Kupferspiegel im Serum hitzeadaptierter Schwerarbeiter. Int. Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg. *25*, 202.

Vallee, B. L., W. E. Wacker, A. F. Bartholomay, E. D. Robin (1956): Zinc metabolism in hepatic dysfunction. I. Serum zinc concentrations in Laennec's cirrhosis and their validation by seqential analysis. New Engl. J. Med. *255*, 403.

Vallee, B. L., W. E. Wacker, A. F. Bartholomay and *F. L. Hock* (1957): Zinc metabolism in hepatic dysfunction. II. Correlation of metabolic patterns with biochemical findings. New Engl. J. Med. *257*, 1055.

Weber, E. (1967): Grundriß der Biologischen Statistik. Stuttgart: Fischer.

Wilke, H., H. Spielmann (1968): Untersuchungen über den Magnesiumgehalt der Leber bei der Cirrhose. Klin. Wschr. *46*, 1162.

Wolff, H. P. (1964): Pathophysiologie und Klinik des Zinkstoffwechsels. Verh. Deutsch. Ges. Inn. Med. *70*, 338.

Alle Rechte, auch die des Nachdrucks, der Mikrokopie, Fotokopie und der Übersetzung vorbehalten.
Werk-Verlag Dr. Edmund Banaschewski, München-Gräfelfing.
Druck: Hieronymus Mühlberger, Augsburg.
Printed in Germany.

L e b e n s l a u f

Am 10. 6. 1943 wurde ich als Sohn des HNO-Facharztes Dr. Horst Skilandat und seiner Ehefrau Gabriele, geb. Schropp in Nürnberg geboren.

1949 bis 1953	Besuch der Volksschulen in Erlangen und Eichstätt
1953 bis 1962	Oberrealschule in Erlangen, Eichstätt und Nürnberg
Juni 1962	Reifeprüfung (Oberrealschule an der Löbleinstraße, Nürnberg)
1962 bis 1969	Medizinstudium an den Universitäten Erlangen - Nürnberg, Kiel und Innsbruck
Oktober 1965	Ärztliche Vorprüfung (Universität Erlangen-Nürnberg)
14. Febr. 1969	Medizinisches Staatsexamen (Universität Erlangen-Nürnberg)

Seit Mai 1969 bin ich als Medizinalassistent in der Klinik Martha-Maria Nürnberg angestellt.

Peter Skilandat